ISSN(e) 2244-8888

Pittieria
41
ENERO-DICIEMBRE 2017
págs. 8—23

ASOCIACIÓN ENTRE MICROSATÉLITES Y LA RESISTENCIA A *Phytopthora megasperma*, EN ÁRBOLES DE *Theobroma cacao* L. II. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

ASSOCIATION OF MICROSATELLITES WITH THE RESISTANCE TO *Phytophthora megasperma* IN *Theobroma cacao* L. TREES. II. ASSOCIATION ANALYSIS

por

MARÍA MARCANO[1], VÍCTOR MORA[1],
RAISA RUMBOS[2], IRAIMA CHACÓN[3],
ÁLVARO GÓMEZ[4], ADRIANA MOYA[2]
y ARGENIS MORA[5]

1 Laboratorio Genética y Química Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. **marseg@ula.ve**
2 Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Local Chama, estado Zulia.
3 CORPOZULIA, Centro Socialista de Investigación y Desarrollo (CESID)-Cacao, estado Zulia.
4 Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Local San Juan de Lagunillas, estado Mérida.
5 Instituto de Investigaciones para el Desarrollo Forestal (INDEFOR), Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

RECIBIDO: noviembre 04 de 2015 / **ACEPTADO:** mayo 07 de 2016

RESUMEN

La obtención de árboles de cacao más productivos, con mejor comportamiento frente a plagas y enfermedades y que además conserven en sus almendras la calidad excepcional que caracteriza al cacao venezolano, son parámetros considerados cuando se pretende aprovechar el potencial de la diversidad genética de esta especie Una de las limitaciones para el progreso en el mejoramiento genético de cultivos, es el escaso conocimiento sobre el determinismo genético de los caracteres de interés. Los estudios de asociación entre marcadores moleculares y caracteres de interés se basan en la relación no aleatoria entre alelos o desequilibrio del ligamiento, que persiste en una población a pesar de ciclos de recombinación y que pueden ser empleados para cartografiar caracteres de selección. En el presente trabajo se valida la posibilidad de encontrar asociaciones entre marcadores moleculares y la resistencia a *P. megasperma*, en una población no estructurada de 42 árboles de cacao Criollo Moderno, basándonos en su genotipo para 8 marcadores microsatélites ubicados en las zonas de resistencia a *Phytophthora* reportadas y en la reacción de resistencia o susceptibilidad a *P. megasperma* de cada árbol, empleando tablas de contingencia y pruebas de *Xi2*. El análisis de asociación detectó 5 microsatélites asociados con la resistencia, mTcCIR17 (GL 4), mTcCIR189 (GL8), mTcCIR8 (GL 9), mTcCIR229 y mTcCIR223 (GL 10), los cuatro primeros reportados como ligados a la resistencia a diversas especies de *Phytophthora* en distintas progenies de cacao y en regiones coincidentes con genes RGA y GDA y el último asociado al color del cotiledón.

PALABRAS CLAVE: *Theobroma cacao*, resistencia a *Phytophthora megasperma*, análisis de asociación, microsatélites.

ABSTRACT

A challenge for the venezuelan cocoa breeding is to select highly productive trees, with a good performance against pests and diseases, whilst preserving the exceptional quality that characterizes the venezuelan cocoa beans. The achievement of these goals greatly depends on the knowledge and management of the genetic diversity of the Criollo cultivars. One of the main limitations to further progress in the genetic improvement of crops is the scarce knowledge on the genetic determinants of traits of interest. Association studies between molecular markers and important traits are based on the non-random relationships between alleles, or linkage disequilibrium, which persist in a population despite recombination cycles therefore, they can be used to map selection traits. The present research validates the likelihood of finding associations between microsatellite markers and the resistance to *Phytophthora megasperma.* The study was carried out in a non-structured population of 42 Modern Criollo cacao trees, based on their genotype for 8 microsatellite markers located in known regions of resistance to *Phytophthora* species and the reaction of resistance or susceptibility of each tree to *P. megasperma*, using contingency tables and *Xi*2 tests. The association analysis detected 5 microsatellites associated to the resistance, mTcCIR17 (LG 4), mTcCIR189 (LG8), mTcCIR8 (LG 9), mTcCIR229 and mTcCIR223 (LG 10), the first four markers reported are linked to the resistance of different cocoa progenies to several species of *Phytophthora* and coinciding with regions of RGA and GDA genes, whilst the latter is associated to cotyledon colour.

KEY WORDS: *Theobroma cacao*, *Phytophthora megasperma* resistance, association analysis, microsatellites.

INTRODUCCIÓN

La apreciada calidad del cacao Criollo venezolano, le brinda un sitio en el mercado internacional con potencial de expansión, dadas las tendencias mundiales de crecimiento en el consumo de cacao. Venezuela posee las condiciones agroecológicas requeridas para el cultivo y además, en nuestro país pueden aún encontrarse materiales genéticos que producen granos de óptima calidad aromática y que son escasos en el mundo (Marcano, 2007). Actualmente son múltiples los problemas que afectan la productividad de nuestro cacao, siendo muy pequeño su aporte a la producción mundial (ICCO 2012).

La selección de genotipos altamente productivos, que conserven las calidades aromáticas de los cacaos Criollos y que además puedan portar genes de resistencia a las enfermedades y plagas más importantes en el país, serían objetivos importantes para programas de mejoramiento del cultivo (Marcano, 2007).

Las estrategias tradicionales de mejoramiento de un cultivo perenne, como el cacao, son esfuerzos de muy largo plazo; sin embargo, individuos excepcionales pueden ser seleccionados y liberados en cualquier fase. La posibilidad de que el cacao pueda ser propagado por injerto, estacas y mediante las más recientes técnicas de propagación rápida (Sodré *et al*., 2006), e incluso el cultivo *in vitro* (Maximova *et al*., 2006), representa una gran ventaja.

Las herramientas de la genómica abren una posibilidad para el entendimiento del determinismo genético de los factores involucrados en los parámetros que constituyen criterios importantes de selección, ofreciendo algunas alternativas que pueden ser de utilidad para acelerar el desarrollo de poblaciones mejoradas (INGENIC, 2000).

La elaboración de mapas genéticos saturados de los cultivos en los cuales se incluyen marcadores genéticos de diversa índole y caracteres de interés, es una estrategia con posibles aplicaciones en lo que se ha denominado la Selección Asistida por Marcadores Moleculares, con la que potencialmente pueden seleccionarse a muy temprana edad, las plantas que portan los alelos que se hayan relacionado con el mejor comportamiento, ya sea en caracteres morfoagronómicos o de calidad, lo que haría más precisa la selección y reduciría costos en el proceso; ello toma mayor importancia en los caracteres de herencia compleja y más aún en cultivos perennes (Tanksley *et al*., 1988).

El CIRAD (*Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*) ha desarrollado un mapa genético de referencia para el cacao a partir de la población segregante originada a partir del cruce de los parentales heterocigotos UPA402 (Forastero del alto Amazonas obtenido del cruce entre IMC60 y Na34) y UF676 (Trinitario seleccionado en Costa Rica) y saturado con 615 marcadores codominantes incluyendo isoenzimas, RFLPs y microsatélites cartografiados (Pugh *et al*., 2004), que constituyen excelentes herramientas para diversos tipos de investigaciones, entre las cuales destaca la utilización de éstos para el estudio de determinismo genético de caracteres de importancia.

Los métodos clásicos para la identificación de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés, entre los cuales los de mayor

importancia son los caracteres cuantitativos, exigen la disponibilidad de una población segregante, preferiblemente proveniente de padres genotipicamente definidos, a la cual se analiza para la mayor cantidad de marcadores posible y a la vez se evalúa en su fenotipo para parámetros de interés, para los que debe también ser polimórfica. Este procedimiento, denominado análisis de QTLs "Quantitative Trait Loci", que son cada uno de los loci que determinan un carácter cuantitativo, busca detectar relaciones estadísticamente significativas entre un marcador y un carácter. Sin embargo, en casos en los que no existen estas poblaciones experimentales, o éstas son difíciles de desarrollar por razones prácticas, también es posible llevar a cabo el análisis de QTLs, como en el caso de poblaciones naturales, como las especies arbóreas perennes, o las poblaciones humanas (Liu, 1998).

Los estudios de asociación se basan en la relación no aleatoria de alelos en una población, lo que es conocido como Desequilibrio del Ligamiento (DDL) (Weir, 1996). Para realizar un estudio de asociación, es necesario conocer como es el DDL en la población y en la región de interés del genoma. Debe determinarse no sólo si éste existe y su magnitud, sino su caída, es decir, el trayecto del cromosoma en el que se pierde la relación entre los alelos, lo que puede analizarse, en una región en particular, o de manera general en todo el genoma. La caída del DDL determina el tamaño mínimo de cromosoma en el que éste es conservado.

Los análisis del DDL en el genoma del cacao han revelado largos fragmentos de cromosomas (hasta 30 cM) que se encuentran en DDL, en los cuales podrían definirse asociaciones estables entre marcadores moleculares y caracteres de interés (Marcano *et al*., 2007).

La cartografía genética por asociación, busca aprovechar las asociaciones no aleatorias que se establecen entre alelos de diferentes loci, ligados o no, (DDL) a través de la historia de una población, para encontrar relaciones entre marcadores y caracteres, que se hayan mantenido a pesar de varios ciclos de recombinación. Con ello, se puede lograr la cartografía genética de caracteres de interés en poblaciones naturales con mejor resolución que en poblaciones experimentales; es, sin embargo importante, que la población no presente estructura (Jannink y Walsh, 2002).

La asociación entre marcadores moleculares y caracteres de importancia para la selección de cacao ya ha probado ser una estrategia eficiente, en comparación con los métodos tradicionales de análisis de Loci determinantes de caracteres Cuantitativos (QTLs), que implican la obtención de poblaciones experimentales provenientes de cruces dirigidos entre padres específicos, lo que puede tardar unos diez años en el caso del cacao (Schnell *et al*. 2005; Marcano *et al*., 2007, 2008).

Phytophthora palmivora es una de las enfermedades de mayor impacto en las plantaciones de cacao del mundo y ha sido la más estudiada en cuanto a la detección de QTLs (Loci de caracteres Cuantitativos) implicados en la resistencia a la misma; estos estudios han sido realizados a partir de mazorcas enfermas y discos de hoja, en progenies de mapeo diversas (N'Goran *et al*., 1997; Clément *et al*., 2003; Risterucci *et al*., 2004).

La resistencia a *Phytophthora* ha sido relacionada con varios genes, este es el caso de *P. megasperma* f.sp. glycinea en soya (Diers *et al*., 1992) y de *P. infestans* en papa, aunque en este cultivo también se ha informado de una resistencia vertical (Corné *et al*., 1991). En el caso del cacao, varios autores han relacionado la resistencia a *Phytophthora* con la presencia de varios genes. Warren (1994) señaló la existencia de un mínimo de cinco loci heterogéneos no ligados. Spence & Bartley (1966) igualmente señalan que algunas progenies F1 del clon SCA 6 que muestran resistencia en Trinidad, son el producto de genes dominantes que controlan esa característica. Enríquez & Salazar (1987) por el contrario, consideran que en la resistencia a *Phytohthora* están en juego varios genes con una acción más aditiva que dominante. En forma similar, Tan & Tan (1990) señalan que la resistencia se hereda en forma aditiva. En general, en los estudios de la resistencia genética del cacao a las enfermedades producidas por especies del género *Phytophthora*, no se ha encontrado una resistencia total a la enfermedad (Risterucci *et al*., 2003).

En el año 2000 se reporta por primera vez, la ubicación de genes de resistencia a *Phytophthora palmivora* en el genoma del cacao, en una población de cacao Forastero (Crouzillat *et al*., 2000); estudios posteriores se han hecho en poblaciones de cacao con diversa base genética y varias especies de *Phytophthora* (Flament *et al*., 2001; Clément, 2003; Risterucci *et al*., 2003). Algunas de las regiones del genoma identificadas como implicadas en la resistencia han sido coincidentes con genes análogos de resistencia y defensa (RGA y DGA) (Lanaud *et al*., 2004). En general, estos estudios muestran coincidencia en 4 sitios del genoma, en los grupos de ligamiento 1 (Lanaud *et al*., 2004; N'Goran *et al*., 1997), 4 (Clément *et al*., 2003 y 2004; Lanaud *et al*., 2004) y 7 (Lanaud *et al*., 2004, Clément *et al*., 2004) que potencialmente portan factores genéticos determinantes de la resistencia.

El presente estudio pretende indagar la posibilidad de aprovechar la información generada en diferentes progenies de mapeo de cacao, en relación a la detección de QTLs que determinan la resistencia a especies de *Phytophthora*, estudiando la asociación entre marcadores moleculares localizados en las zonas del genoma donde se han encontrado en forma consistente estos QTLs y la resistencia a *Phytophthora megasperma*, en una población de cacao Criollo moderno no experimental y no estructurada.

MATERIALES Y MÉTODOS

EVALUACIÓN DEL FENOTIPO

La selección de plantas de cacao de la población original, el muestreo de mazorcas a ser sometidas a la evaluación de resistencia, los procedimientos para la preparación del inóculo, la inoculación de las mazorcas con *P. megasperma* y la evaluación de resistencia/susceptibilidad de las plantas al patógeno (fenotipo), son extensamente descritos en Mora *et al.* (2016).

ANÁLISIS DEL GENOTIPO

Las metodologías empleadas para la extracción del ADN, la amplificación de los microsatélites y la electroforesis de microsatélites en geles de poliacrilamida es descrita en Risterucci *et*

al. (2000); la visualización de microsatélites mediante la tinción de nitrato de plata se hizo como se reporta en Bassam *et al.* (1991). La lectura e interpretación de geles y el análisis completo del genotipo se presentan en Mora *et al.* (2016). La lista de microsatélites analizados, se presenta en Mora *et al.* (2016), en donde se destacan los microsatélites ubicados en zonas de QTLs y de genes DGA y RGA reportados (Crouzillat *et al.*, 2000; Flament *et al.*, 2001; Clément *et al.*, 2003; Risterucci *et al.*, 2003; Lanaud *et al.*, 2003). El resto de microsatélites analizados se emplearon para el estudio de la estructura de la población.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN LA POBLACIÓN ORIGINAL

La estrategia para analizar la existencia de subpoblaciones (estructura) en la población original (65 individuos) consistió en el análisis de 16 microsatélites no ligados (independientes), con el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000); a partir de éste se puede inferir el número de subpoblaciones (K) que pudieran coexistir en la población estudiada, bajo la presunción de Equilibrio de Hardy y Weinberg en las subpoblaciones. Para ello se consideraron valores alternativos de K, desde 1 al 5, un número de 50.000 iteraciones como períodos de procesamiento, 250.000 repeticiones y 10 análisis independientes, bajo el supuesto modelo de “mezcla de ancestros” (“Admixture”).

Este análisis permitió identificar individuos que por su constitución genética, difieren mucho del resto de la población. Por otra parte, se verificó el número de subpoblaciones presentes en la población estudiada y la contribución de cada individuo a la conformación de esas subpoblaciones.

A partir de estos resultados se pudieron seleccionar individuos que en conjunto formarán una población no estructurada y por ende más ajustada para un estudio de asociación entre los marcadores microsatélites y la resistencia a la enfermedad (Cuadro 1).

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Tomando en cuenta la información genotípica de cada individuo, así como su nivel de resistencia a la enfermedad, se elaboraron tablas de contingencia utilizando el programa Excel (Microsoft Office Excel vers. 2007), para cada locus de microsatélites analizados. La información compilada en estas tablas fue graficada con el fin de visualizar tendencias de los genotipos más frecuentemente susceptibles o resistentes en la población no estructurada.

La asociación entre marcadores microsatélites y la resistencia a la enfermedad se determinó mediante una Prueba de *Xi2* para el análisis de tablas de contingencia con el método de Pearson, considerando un umbral de significación de $p \leq 0{,}05$ para cada prueba (loci microsatélites), utilizando el programa XlSTAT 7.5.2 (ADDINSOFT, 2015).

RESULTADOS

ANÁLISIS DEL FENOTIPO Y DEL GENOTIPO

En el artículo complementario al presente (Mora *et al.*, 2016), se muestran en detalle los resultados obtenidos, tanto en la evaluación de la reacción de resistencia/susceptibilidad de las plantas seleccionadas, al patógeno *Phytophthora*

megasperma (fenotipo), como en el análisis de los loci microsatélites analizados (genotipo). Esta información es base para el análisis de asociación entre marcadores microsatélites y la resistencia a *P. megasperma*.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN Y DEL NÚMERO DE SUBPOBLACIONES

Los resultados obtenidos mediante el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000), para el que se emplean datos del genotipo de marcadores no ligados, ni en desequilibrio del ligamiento, revelaron la existencia de 2 subpoblaciones en la población original.

SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN NO ESTRUCTURADA

A partir de la información proporcionada por el programa *Structure*, en relación a la contribución de cada planta a la formación de las dos subpoblaciones detectadas, se ajustó una nueva lista de individuos para conformar una población no estructurada. En total se seleccionaron 42 individuos *(CUADRO 1)* con los cuales fue posible realizar los análisis de asociación. Esta selección se efectuó eliminando aquellas plantas que portaban más de 95% del ancestro Criollo, así como los individuos muy diferentes a los de la población no estructurada.

CUADRO 1. Árboles seleccionados para conformar población no estructurada y su procedencia.

ID	LOCALIDAD	ID	LOCALIDAD	ID	LOCALIDAD
SJU04R	INIA-San Juan	BEN17	INIA-San Juan	BEN04	INIA-San Juan
SJU05	INIA-San Juan	BEN19	INIA-San Juan	BEN23	INIA-San Juan
SJU07	INIA-San Juan	BEN21	INIA-San Juan	UVI01	CORPOZULIA
SJU09	INIA-San Juan	BEN22	INIA-San Juan	UVI03	CORPOZULIA
SJU11	INIA-San Juan	BOC01	INIA-San Juan	ABA01X	CORPOZULIA
SJU12	INIA-San Juan	BOC04	INIA-San Juan	CAC01	CORPOZULIA
SJU13	INIA-San Juan	BOC05	INIA-San Juan	LOB13	CORPOZULIA
SJU14	INIA-San Juan	BOC14	INIA-San Juan	ADJ05	CORPOZULIA
SJU15	INIA-San Juan	42	INIA-San Juan	UV103	CORPOZULIA
SJU16	INIA-San Juan	HER1	INIA-San Juan	SP10X	CORPOZULIA
BEN05	INIA-San Juan	81	INIA-San Juan	CBL04	CORPOZULIA
BEN11	INIA-San Juan	04	INIA-San Juan	CBL05	CORPOZULIA
BEN12	INIA-San Juan	02	INIA-San Juan	CBL06	CORPOZULIA
BEN15	INIA-San Juan	BEN01	INIA-San Juan	ABA01	CORPOZULIA

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Mediante el análisis de asociación entre los genotipos y la respuesta fenotípica de éstos a la resistencia a la infección por *P. megasperma* (**CUADRO 2**), se encontró que, de los 7 marcadores microsatélites ligados a la resistencia a especies de *Phytophthora* que se evaluaron, 4 marcadores se encontraron asociados a la resistencia a *P. megasperma* en los individuos seleccionados; de igual modo, el marcador previamente reportado como asociado al color de cotiledones, también se encontró en asociación con la resistencia a la enfermedad en la población de estudio.

De estos marcadores asociados, mTcCIR17 se localiza en el grupo de ligamiento 4 (**FIGURA 2**), mTcCIR189 en el grupo de ligamiento 8, mTcCIR8 en el grupo de ligamiento 9, mTcCIR229 y mTcCIR223 en el grupo de ligamiento 10. El resto de marcadores analizados no mostraron asociación significativa con la resistencia a "Mancha de Agua".

Al analizar los gráficos que se efectuaron de las tablas de contingencia entre el genotipo y las frecuencias de fenotipos (ejemplo en la **FIGURA 1**), se aprecia que el genotipo que muestra en mayor grado la resistencia es el híbrido, mientras que el genotipo homocigoto criollo se relaciona con la menor resistencia, en cada uno de los loci microsatélite analizados.

CUADRO 2. Análisis de asociación (Xi^2) entre marcadores microsatélites y resistencia a *P. megasperma*.

GL	MARCADOR	cM	Xi^2	GdL	P
1	**mTcCIR272**	36,9	7,852	6	0,249
1	mTcCIR286	68,3	7,040	4	0,134
2	mTcCIR268	38,8	8,403	4	0,078
3	mTcCIR120	6,3	2,430	4	0,657
3	mTcCIR82	30,6	1,181	4	0,881
3	mTcCIR167	59,2	3,806	2	0,149
4	**mTcCIR17**	23,4	11,828	4	0,019*
5	mTcCIR109	72	12,255	6	0,057
6	**mTcCIR255**	39,1	1,232	2	0,540
7	mTcCIR190	3,8	1,073	2	0,585
7	**mTcCIR55**	35,5	2,955	4	0,565
8	**mTcCIR189**	46,9	9,520	4	0,049*
9	**mTcCIR8**	52,5	11,273	4	0,024*
9	mTcCIR79	94,1	5,049	2	0,080
10	**mTcCIR229**	11,9	12,123	4	0,016*
10	*mTcCIR223*	72,4	9,323	2	0,009*

GL Grupo de ligamiento,

cM: Ubicación de los microsatélites en unidades centiMorgans con base en el mapa de referencia para el cacao (Pugh *et al*., 2004),

GdL grados de libertad. Umbral de significancia $P<0.05$,

* estadísticamente significativo, en negritas: marcadores ligados a QTLs o a genes RGA DGA, en itálicas: marcador asociado a color del cotiledón.

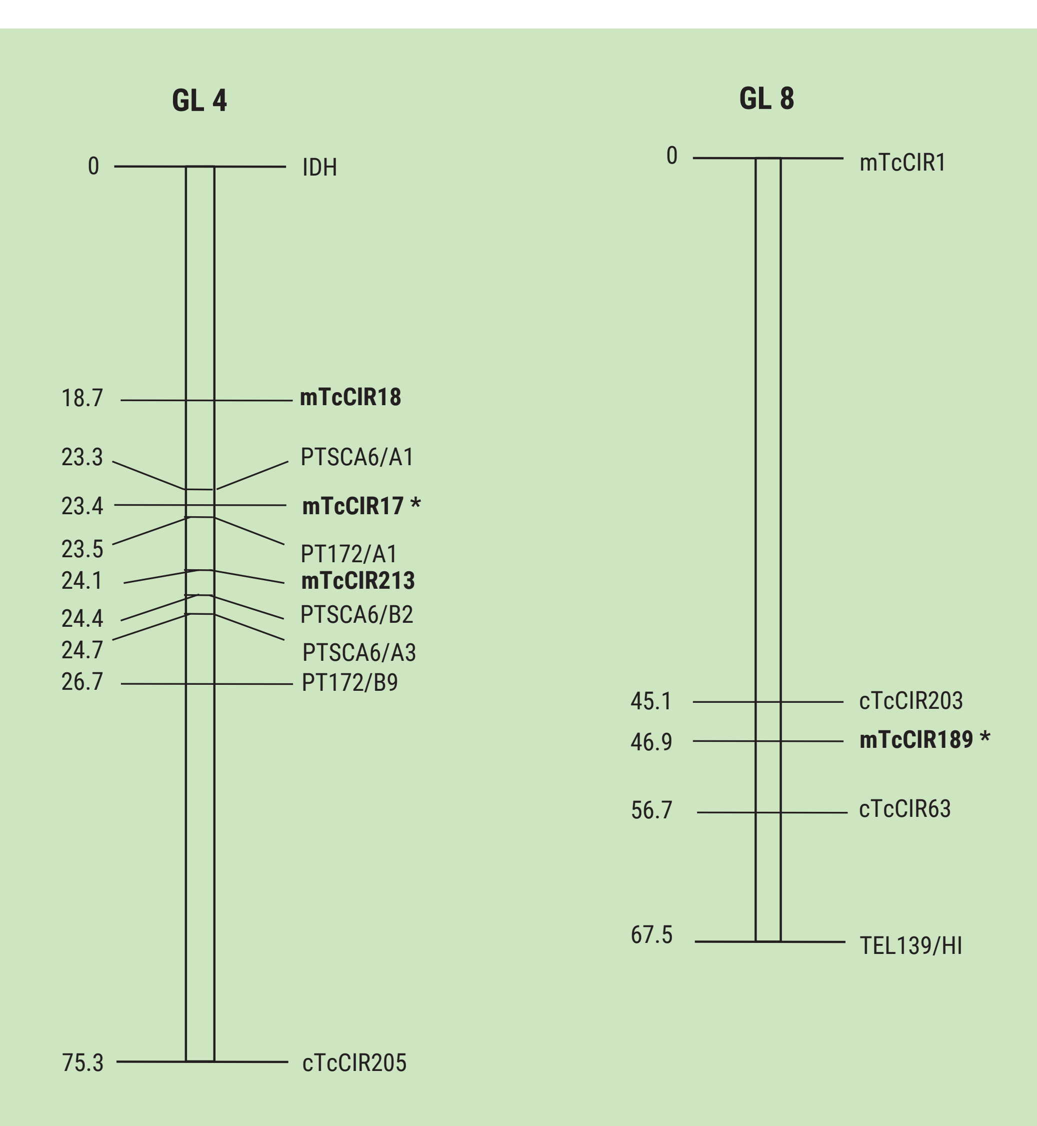


FIGURA 1. Asociación entre la resistencia de árboles de cacao a *P. megasperma* y el genotipo para el microsatélite mTcCIR229.

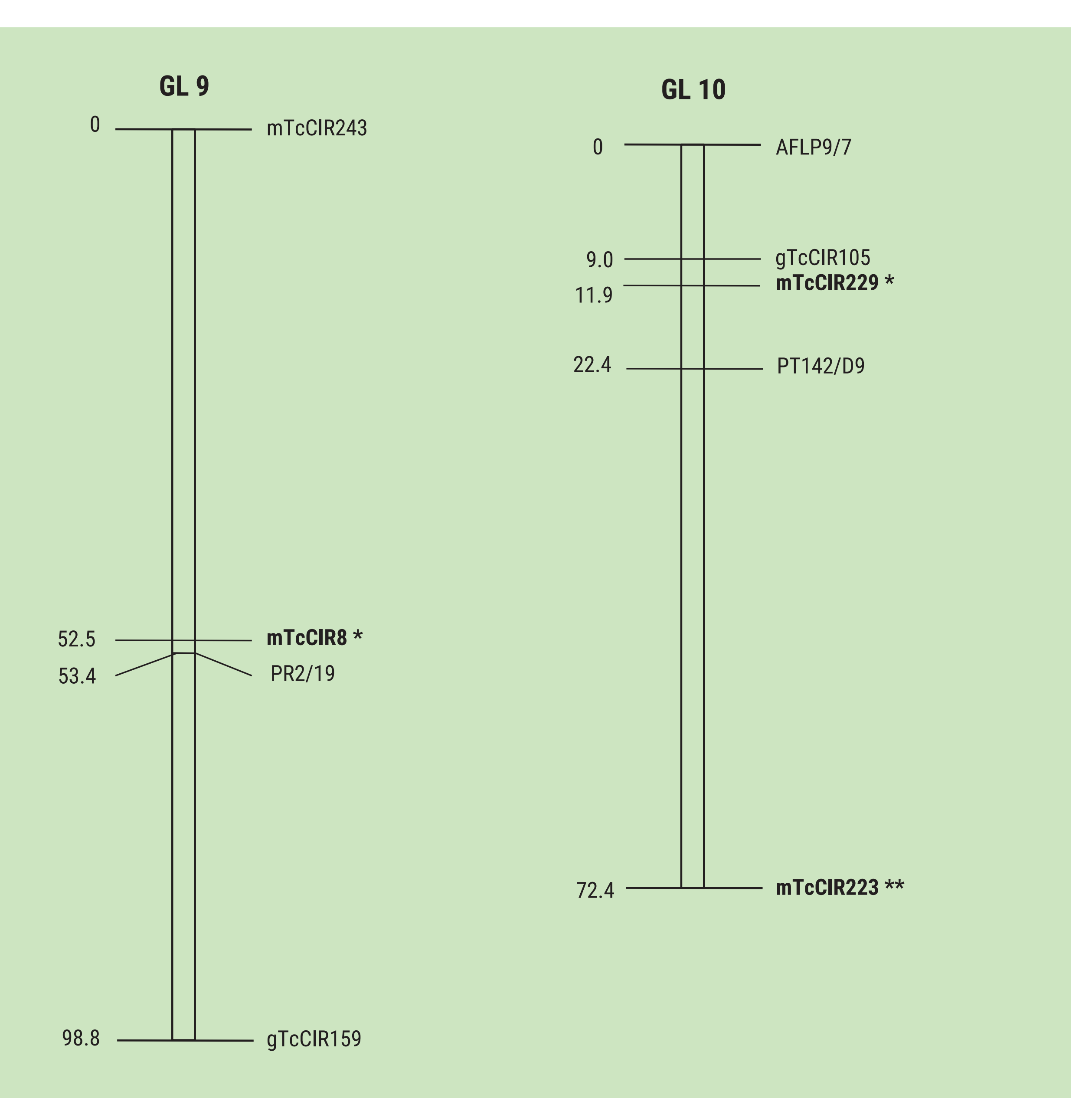


FIGURA 2. Ubicación de QTL's de resistencia a *Phytophthora palmivora*, análogos de genes RGA y DGA en progenies de cacao de diversa base genética, microsatélites asociados a color de diversas estructuras de la planta y microsatélites asociados a la resistencia a *Phytophthora megasperma* en la población estudiada. **GL**: Grupo de ligamiento y ubicación de los microsatélites en unidades centiMorgans en el mapa de referencia para el cacao (Pugh *et al.,* 2004), en negritas: marcadores ligados a QTLs o a genes RGA y DGA (Clément *et al*., 2003; N'Goran *et al*., 1997 y Lanaud *et al*., 2004), *: microsatélites asociados en este estudio a la resistencia a *P. megasperma*, **: microsatélite asociado a la resistencia en este estudio y al color del cotiledón en Marcano *et al*. (2008).

DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

El análisis de la estructura de la población, realizado mediante el programa Structure, permitió evidenciar la existencia de dos (2) subpoblaciones. En el análisis se encontró el solapamiento de un grupo de individuos (Criollos con alta homocigosis), evidencia clara de que no existe una diferenciación genética entre éstos, mientras que otro grupo de individuos presentó dispersión, siendo ésta extrema para tres árboles (LOB38, RA01 y RA05) que se consideraron fuera de tipo.

La estratificación de la población, evidenciada por la existencia de dos subpoblaciones, de acuerdo al análisis, resulta ser no funcional para realizar estudios de mapeo por asociación (Flint-García *et al.*, 2003); por esta razón, sería difícil efectuar un estudio de asociación con todos los cultivares seleccionados; ello justificó el ajuste de la población, a fin de eliminar aquellos individuos que contribuían al establecimiento de la estructura poblacional, según los resultados obtenidos mediante el programa *Structure*. La eliminación de estos individuos generó una población no estructurada, más adecuada para el estudio de mapeo por asociación. Este procedimiento ha mostrado ser apropiado en previos estudios de asociación (Marcano *et al.*, 2007).

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES MICROSATÉLITES Y LA RESISTENCIA A P. MEGASPERMA

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de asociación entre marcadores moleculares y la resistencia a *P. megasperma*, se encontraron 5 marcadores asociados a ésta en la población estudiada. El marcador mTcCIR17 en el grupo de ligamiento 4, mTcCIR189 en el grupo de ligamiento 8, mTcCIR8 en el grupo 9 y en el 10 los microsatélites mTcCIR229 y mTcCIR223 (*FIGURA 2*).

El reporte del marcador mTcCIR17 ubicado en el cromosoma 4, es coincidente con estudios previos, en los cuales se encontraron QTLs ligados a la resistencia a especies de *Phytophthora* en esta zona del genoma, en progenies de diversa base genética (Clément *et al.*, 2003). Lanaud *et al.* (2004) en sus trabajos encuentran esta región ligada a genes candidatos RGA (Resistance Gene Analogs) de las clases N y Pto (*FIGURA 2*).

Los genes que confieren resistencia en las plantas se clasifican en dos grupos, uno conformado por genes involucrados en el reconocimiento del patógeno llamados genes RGA, (*Resistance Gene Analogs*) y el otro grupo de genes implicados en los mecanismos de defensa de la planta, frente al reconocimiento del patógeno (genes DGA o *Defense Gene Analogs*) (Agrios 2005). Los genes N aislados en tabaco, están relacionados con proteínas receptoras citoplasmáticas que contienen dominios ricos en leucinas, mientras que los genes Pto de tomate, son del grupo Kinasa y contienen dominios serina-treonina-kinasa (STK) involucrados en la transducción intracelular, o están asociados a estructuras receptoras de kinasa.

Los estudios de Lanaud *et al.* (2004), llevados a cabo mediante la amplificación por PCR de fragmentos de genes análogos de RGA y DGA, en la población de referencia del cacao (UPA402 x UF676) (Pugh *et al.*, 2004), permitieron ubicar en el grupo de ligamiento 4 a los genes PTSCA6/A1 (a 23,3 centiMorgans), PT172/A1 (a 23,5 cM), PTSCA6/B2 (a 24,4 cM), PTSCA6/A3 (a 24,7 cM) y PT172/B9 (a 26,7 cM) ***(FIGURA 2)***.

Tomando en cuenta que el marcador microsatélite (mTcCIR17) está distanciado a 23,4 cM con respecto al mismo mapa de ligamiento para el cacao ***(FIGURA 2)***, se asume que existiría una estrecha asociación entre este marcador microsatélite y los genes encontrados por Lanaud *et al.* (2004).

Clément *et al.* (2003) encontraron QTL's de la resistencia a *Phytophthora* cerca del marcador mTcCIR18 (18,7 cM–24,1cM) en dos poblaciones de cacao. Cabe destacar que, en las mismas regiones del cromosoma 4 donde se encuentra la resistencia, Clément *et al.* (2003), reportan ligamiento entre QTLs implicados en vigor y QTLs ligados al peso de las semillas en dos poblaciones de mapeo IMC78 y DR1. Según estos resultados, los autores sugieren una relación entre la resistencia de las plantas de cacao a *Phytophthora palmivora* y el peso de las semillas.

Realizando estudios de asociación en poblaciones de cacao que incluían desde criollos hasta forasteros, Marcano *et al.* (2007) encontraron en esta región al marcador mTcCIR213 (24,1 cM) del grupo de ligamiento 4, también asociado al peso de la semilla y del fruto y, en una población venezolana cultivada de cacao, asociados además a la pigmentación de distintas estructuras de la planta como fruto, cotiledones y partes florales (Marcano *et al.*, 2008).

Con respecto al marcador mTcCIR189, encontrado en el grupo de ligamiento 8 y ubicado a 46,9 cM según el mapa de ligamiento de referencia (Pugh *et al.*, 2004), también se encuentra coincidencia en trabajo previos, en los cuales los marcadores cTcCIR203 (56,7 cM) y cTcCIR63 (45,1 cM) se encuentran ligados a la resistencia a especies de *Phytophthora* (N'Goran *et al.*, 1997). Estos autores también reportan QTLs relacionados con el peso del grano (cTcCIR98 a 46,5 cM) en el mismo grupo de ligamiento bastante cercano al asociado a la resistencia mTcCIR8, lo que apoya lo propuesto por Clément *et al.* (2003) sobre la relación entre la resistencia y el peso de las semillas.

En los grupos de ligamiento 9 y 10 también se encuentra coincidencia entre los marcadores microsatélites asociados a la resistencia con QTLs reportados en otros trabajos. Lanaud *et al.* (2004) encuentran al DGA PR2/19 en el grupo de ligamiento 9 a una distancia de 53,4 cM de acuerdo al mapa de ligamiento de referencia para el cacao. Este gen se encuentra muy cerca del marcador encontrado en este trabajo mTcCIR8 (52,5 cM), lo que evidenciaría una asociación entre el marcador y el gen PR2/19 implicado en la respuesta de defensa.

Una vez más se afirma la asociación entre la resistencia y características morfológicas de las semillas, cuando N'Goran *et al.* (1997) encuentran para el mismo grupo de ligamiento, el marcador gTcCIR102 (59 cM) ligado a un QTL de longitud de las semillas, al igual que Marcano *et al* (2008) que reportan en esta región, varios marcadores: mTcCIR58 (60,1 cM),

mTcCIR142 (47,4 cM) y mTcCIR124 (40,1 cM) asociados a dimensiones de la semilla.

En el grupo de ligamiento 10 se encuentra asociación entre los marcadores mTcCIR229 (11,9 cM) y mTcCIR223 (72,4 cM). Reportes hechos por N'Goran *et al* (1997) indican que el marcador gTcCIR105 está ligado a la resistencia a *Phytohthora* spp. en zonas muy cercanas al mTcCIR229 y Lanaud *et al*. (2004) reportan en esta zona al gen candidato PT142/D9.

Con respecto al marcador mTcCIR223, asociado a la resistencia a *P. megasperma*, Marcano *et al*. (2008) lo encuentra asociado con diversos caracteres del fruto y de las semillas, además del color de los cotiledones y de estaminodios.

Los caracteres de la semilla, como dimensiones y color, son parámetros que diferencian individuos Criollos de Forasteros. Así como la resistencia a *Phytophthora* parece estar favorecida en los híbridos, la pigmentación y el tamaño pequeño de las almendras, son caracteres típicos de forasteros e híbridos; por el contrario, las semillas grandes, redondeadas y no pigmentadas, son características de los Criollos, de allí la relación estadística que puede explicar la ubicación de estos caracteres (resistencia, dimensiones de la semilla y pigmentación), en algunas regiones genómicas coincidentes, en las cuales estos caracteres podrían por ende, estar ligados físicamente o estar asociados por desequilibrio del ligamiento.

Por otro lado, las antocianinas, que producen la pigmentación en diversas estructuras del cacao, pudieran relacionarse con la resistencia bioquímica constitutiva o preformada que actúa desde el inicio de la infección, lo que explicaría la resistencia del cacao a especies de *Phytophthora* localizada en las mismas regiones de la pigmentación de estructuras del GL 4 y del GL 10 (Marcano *et al*., 2008).

CONCLUSIONES

El análisis de estructura permitió verificar que 2 subpoblaciones conformaban la población original, lo cual justificó la selección de individuos para obtener una población no estructurada adecuada para realizar estudios de asociación.

Mediante el análisis de asociación se lograron confirmar, en la población de árboles seleccionados estudiada, 4 de las 7 regiones previamente reportadas, ligadas a la resistencia a diferentes especies de *Phytophthora* y a genes análogos de resistencia y defensa.

Se logró comprobar la estabilidad de algunas regiones implicadas en la resistencia a especies de *Phytophthora*, siendo éstas coincidentes en otros estudios efectuados con poblaciones de diversa base genética, mediantes análisis de QTLs.

Para los loci microsatélites que se encontraron asociados a la resistencia a *P. megasperma*, el genotipo que muestra en mayor grado la resistencia es el híbrido, mientras que el genotipo homocigoto criollo se relaciona con la menor resistencia.

Se encontraron asociados a la resistencia a *P. megasperma*, 2 regiones del genoma previamente reportadas como asociadas a la pigmentación de distintos órganos de la planta de cacao.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el CDCH-TA de la Universidad de Los Andes, mediante el Proyecto C-1571-08-01-B. Agradecemos a la Dra. Francisca Ely por su colaboración en la traducción del resumen al idioma inglés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDINSOFT. 2015. *XLSTAT 2015: Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel*. Paris, France.

AGRIOS, G. 2005. *Plant Pathology*. 5ta Edición. ELSEVIER Academic Press.

BASSAM, B., CAETANO-ANOLLÉS, G. & P. GRESSHOFF. 1991. A fast and sensitive silver-staining for DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.

BLAHA, G., ESKES, A., KÉBE, B. I. & G.M. TAHI. 2000. Early screening of resistance to *Phytophthora* spp. by means of leaf disc inoculation. *In*: Working procedures for cocoa germoplasm evaluation and selection. Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project workshop (A. Eskes, J.M.M. Engels and R.A. Lass, eds.). Montpellier, France. Rome: IPGRI, pp. 103-108.

CLÉMENT, D., RISTERUCCI, A.M., MOTAMAYOR, J.C., N´GORAN, J.A.K. & C. LANAUD. 2003. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. Genome. 46: 204-212

CORNÉ, M.J., RISSEEUW, E.P. & E.P. DAVIDSE. 1991. An in plant induced gene of *Phytophthora infestans* codes for ubiquin. *Plant Molecular Biology*, 17: 799-811.

CROUZILLAT, D., PHILLIPS, W., FRITZ, P. & V. PÉTIARD. 2000. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. Euphytica. 114: 25-36.

DIERS, B.W., MANSUR, L., IMSANDE, J. & R.C. SHOEMAKER. 1992. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with Restriction Fragment Length Polymorphism markers. Crop Science 32(2): 377-383

ENRIQUEZ, G.A. & L.G. SALAZAR. 1987. Cocoa varietal resistance to *Phytophthora palmivora* and its inheritance at Turrialba, Costa Rica. Turrialba, Costa Rica, 13 p.

FLAMENT, M., KEBE, I., CLEMENT, D., PIERETTI, I., RISTERUCCI, A.M., N'GORAN, J.A.K., CILAS, C., DESPRÉAUX, D. & C. LANAUD. 2001. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. Genome. 44: 79-85

FLINT-GARCIA, S., THORNSBERRY, J. & E. BUCKLER IV. 2003. Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 357-374.

ICCO. International Cocoa Organization. Report 2011-2012. London, United Kingdom.

INGENIC 2000. Proc. of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding. Malaysia, 16-17 October.

JANNINK, J. & B. WALSH. 2002. Association Mapping in Plant Populations. In Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. (ed. M.S. Kang). CAB International. pp 59-68.

LANAUD, C., RISTERUCCI, A.M., PIERETTI, I., N´GORAN, J.A.K. & D. FARGEAS. 2004. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). Molecular Breeding. 13: 211-227.

LIU, B. 1998. Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis. CRC Press, USA. 611 p.

MARCANO, M. 2007. Cartografía genética de factores del rendimiento y caracteres morfológicos en una población cultivada de cacao criollo “moderno” (*Theobroma cacao* L.), mediante un análisis de asociación. Universidad de Los Andes. Facultad de Medicina, Postgrado en Ciencias Médicas Fundamentales. Mérida, Venezuela. 127 p. (Tesis Doctoral)

MARCANO, M., PUGH, T., CROS, E., MORALES, S., PORTILLO, E., COURTOIS, B., GLASZMANN, J.C., ENGELS, J.M.M., PHILLIPS, W., ASTORGA, C., RISTERUCCI, A.M., FOUET, O., GONZÁLEZ, V., ROSENBERG, K., VALLAT, I., DAGERT, M. & C. LANAUD, 2007. Adding value to cocoa *Theobroma cacao* L. germplasm information with domestication history and admixture mapping. Theor. Appl. Gen. 1008:1151-1161.

MARCANO, M., MORALES, S., HOYER, M.T., COURTOIS, B., FOUET, O., PUGH, T., CROS, E., DAGERT, M, GONZÁLEZ, V. & C. LANAUD. 2008. A genomewide admixture mapping study for yield factors and morphological traits in a cultivated cocoa (*Theobroma cacao* L.) population. Tree Genetics and Genomes 5(2):329-337.

MORA, V. MARCANO, M., RUMBOS, R., CHACÓN, I., GÓMEZ. A., ROSALES, M, & A.MORA. 2016. Asociación entre microsatélites y la resistencia a *Phytopthora megasperma*, en árboles de *Theobroma cacao* L. I. Análisis del fenotipo y del genotipo. Pittieria 40: 144-163.

MAXIMOVA, S., YOUNG, A., PISHAK, A. & M. GUILTINAN. 2006. Evaluación de plantas de cacao propagadas a través del cultivo de tejidos y métodos tradicionales. 15ª Conferencia Internacional sobre Investigaciones del Cacao. San Jose, Costa Rica, 9-14 Octubre.

N´GORAN, J.A.K., RISTERUCCI, A.M., CLEMENT, D., SOUNIGO, O., LORIEUX, M. & C. LANAUD. 1997. Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) in *Theobroma cacao* L. Agronomie Africaine 9: 55–63.

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.

PUGH, T., FOUET, O., RISTERUCCI, A.M., BROTTIER, P., ABOULADZE, M., DELETREZ, C., COURTOIS, B., CLÉMENT, D., LARMANDE, P., N´GORAN, J.A.K. & C. LANAUD. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite marker. Theor. Appl. Gen. 108: 1151-1161.

RISTERUCCI, A.M., PAULIN, D., DUCAMP, M., N´GORAN, J.A.K. & C. LANAUD. 2003. Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora*. Theor Appl Genet 108: 168-174

SCHNELL R.J., OLANO, C.T., BROWN, J.S., MEEROW, A.W. & C. CERVANTES-MARTÍNEZ. 2005. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L) seedlings and association of microsatellite alleles with productivity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130(2): 181-190.

SODRÉ, G.A., DE SOUSA, J.O., CORÁ, J.E. & A. BARRETO. 2006. Sustratos para enraizamiento y crecimiento de miniestacas de cacao. 15ª Conferencia Internacional sobre Investigaciones del Cacao. San José, Costa Rica, 9-14 Octubre.

SPENCE, JA. & B.G. BARTLEY. 1966. Testing of breeding material of *Theobroma cacao* for resistance to black pod disease (*Phytophthora palmivora*). Second session of FAO Technical Working Party on Cocoa Production and Protection. FAO.

TAN, GY. & W.K. TAN. 1990. Additive inheritance of resistance to pod rot caused by *Phytophthora palmivora* in cocoa. Theor. Appl. Genet. 80: 258-264

TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. & M.W. BONIERBALE. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology 7: 257-263.

WEIR B. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachussets.